(مقاله پژوهشي)

بررسي مولكولار اپيدميولوژي شيگلا سونه‌اي جدا شده از موارد باليني در تهران با روش RAPD-PCR

آرمان رستم زاد*[1], سيد حميد زركش اصفهاني**, جليل انتشاري***

چكيده

زمينه و هدف: شيگلوز به وسيله انواع سويه‌هاي شيگلا ايجاد مي‌شود اغلب در كمتر از ۱۵ سال ديده مي‌شود. اين بيماري بسيار مسري و در جوامع با سطح پايين بهداشت به شكل اپيدميك و آندميك بروز مي‌نمايد و با كاهش رشد كودكان و سندروم اورمي همولیتیك (Hemolytic uremic syndrome) همراه مي باشد. چون كه ميزان ابتلاء به شيگلا سونه‌اي در بين گروه‌هاي سني مختلف مي‌تواند يك شاخص بهداشتي در ارزيابي كيفيت بهداشت يك جامعه باشد، بنابراين در طول سال‌هاي ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۵ در بيمارستان‌هاي تهران ميزان آلودگي گروه‌هاي سني مختلف به شيگلا سونه‌اي به روش RAPD-PCR(Random Amplified Polymorphic DNA) مورد ارزيابي قرار گرفت.

روش بررسي: در اين بررسي جمعاً ۶۰ ايزوله شيگلا سونه‌اي مربوط به ۳۶ پسر (۶۰ درصد) و ۲۴ دختر(۴۰ درصد) مورد مطالعه قرار گرفتند. ايزوله‌ها به دو روش بيوشيميايي (تست حركت، MR، سيترات،H_2S، اندول، ليزين دكربوكسيلاز، اورنتين دكربوكسيلاز و ONPG) و سرولوژي تاييد و سپس جهت تأييد نهايي ايزوله‌هاي شيگلا سونه‌اي از تست RAPD-PCR استفاده شد.

يافته ها: اين ۶۰ بيمار به پنج گروه سنی مختلف تقسيم شدند كه در بين آنها بيشترين ميزان شيوع ۲۲ بيمار (۳۶/۷ درصد) در گروه سني يك تا دو سال قرار گرفتند و كمترين ميزان شيوع ۱/۶ درصد در گروه سني بيشتر از ۹ سال مشاهده گرديد.

نتيجه گيري: مطالعه حاضر نشان داد كه روش RAPD-PCR قدرت تمايز دهندگي نسبتاً مناسبي دارد و به واسطه داشتن قدرت افتراقي بالا، قابليت تيپ بندي و تكرار پذيري، كم هزينه، سريع و آسان بودن مي تواند روش مناسبي جهت طبقه بندي ايزوله‌هاي شيگلا در مطالعات اپيدميولوژيكي باشد. *م ع پ ۱۳۸۹؛۹ (۳): ۲۸۹- ۲۷۹*

كليد واژگان: شيگلوز، اپيدميولوژي، RAPD-PCR

*دانشجوی دكتراي ميكروبيولوژي، دانشگاه اصفهان

**استاديار بخش ميكروبيولوژي، دانشگاه اصفهان

***كارشناس گروه زيست شناسي، دانشگاه اصفهان

۱-نويسنده مسوول:Email:arostamzad381@yahoo.com

دريافت مقاله ۱۳۸۷/۱۲/۱۰ دريافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۹/۱/۱۷ اعلام قبولي: ۱۳۸۹/۱/۳۱

مقدمه

شيگلا عامل بيماري خطرناك اسهال خوني (شيگلوز) به ويژه در كودكان كم سن و سال است؛ به طوري كه ۷۰ درصد از موارد عفونت را كودكان كمتر از ۱۵ سال تشكيل مي‌دهند. اين بيماري نسبت به ساير اشكال گاستروانتريت از شدت بالاتري برخوردار بوده و با اسهال خوني، دردشكمي، تب، بي‌حالي و كسالت مشخص مي‌گردد. بيماري شيگلوز از طريق دهاني- مدفوعي انتقال يافته كه در وهله اول از طريق دست‌هاي آلوده افراد و به ميزان كمتر از طريق آب و غذاي آلوده منتقل مي‌شود (۱).

بيماري شيگلوز بسيار مسري بوده و مي‌تواند به سرعت در ميان جوامع با استانداردهاي بهداشتي و سطح پايين بهداشت شخصي انتشار يابد. در مناطق جغرافيايي آندميك شيگلوز، اوج بروز ديسانتري در ۱۸ تا ۲۴ ماهگي به وقوع مي‌پيوندد و تا سن ۵ سالگي در بين كودكان در برخي جوامع در حد نسبتاً بالايي باقي مي‌ماند(۴،۳،۲).

روش‌هاي طبقه بندي متعددي جهت گروه بندي سويه‌هاي شيگلا طراحي شده است. در ارزيابي سيستم‌هاي طبقه بندي در مطالعه هاي اپيدميولوژي بر روي عوامل عفوني چندين معيار اساسي از جمله قدرت افتراقي تكنيك، قابليت تيپ‌بندي و تكراريذيري بسيار مهم مي‌باشند. چندين روش نيز بر پايه فنوتيپي يا ژنوتيپي جهت طبقه بندي شيگلا طراحي گرديده است(۶،۵).

روش‌هاي فنوتيپي كه براي طبقه بندي شيگلا به كار رفته‌اند، قدرت افتراق دهندگي كمي دارند. سيستم‌هاي طبقه بندي بر اساس آزمايش پلاسميدها و باكتريوفاژتايپينگ نيز در مورد شيگلا استفاده شده‌اند. اما رديابي اپيدمي‌هاي ناشي از شيگلا با روش‌هاي سنتي بسيار وقت‌گير بوده و همچنين در خيلي از موارد نمي‌توان به درستي سويه‌هاي دخيل در اپيدمي را از سويه‌هاي آندميك متمايز نمود. همچنين استفاده از آنها به علت غيرتيپ‌بندي بودن برخي سويه‌ها با محدوديت‌هايي همراه بوده است. جهت حل اين مشكل ها نياز است از روش‌هاي با قدرت تكراريذيري بالا، كم‌هزينه، سريع و آسان جهت طبقه بندي ايزوله‌هاي شيگلا استفاده شود(۶،۵).

روش‌هاي طبقه بندي ژنوتيپي به علت پايداري در بيان ژن‌ها و اينكه آنها تا حد زيادی در بين گونه‌ها حفظ شده‌اند و قدرت بالاي تمايزدهندگي، بر روش‌هاي فنوتيپي ارجحيت دارند. به كارگيري روش‌هاي بيولوژي ملكولي در بيشتر آزمايشگاه‌هاي ميكروبيولوژي باعث شده است تمايل به استفاده از روش‌هاي ژنوتايپينگ از جمله PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) و ريبو تايپينگ بر اساس آناليز ساترن بلات قطعات برش داده شده اپرون‌هاي ريبوزومي، و روش‌هاي بر پايه PCR همانند AP-PCR(Arbitary primer)، RAPD -PCR و ERIC-PCR

(Enterobacterial Repetiter Intergenic Consensus) و

REP-PCR (Repetitre Extragenic Palindromi) بيشتر شود (۵).

از آنجائي كه ميزان ابتلاء به شيگلا سونه‌اي در بين گروه‌هاي سني مختلف مي‌تواند به عنوان يك شاخص بهداشتي در ارزيابي كيفيت بهداشت يك جامعه مورد توجه باشد و از طرفي تخمين‌ها و گزارش‌هاي ارائه شده در مورد شيوع شيگلوز خيلي كمتر از ميزان واقعي آن مي‌باشند زيرا در اكثر موارد بيماري را فقط از طريق بررسي‌هاي آزمايشگاهي تشخيص مي‌دهند، بنابراين در اين مطالعه سعي شده تا با استفاده از روش‌هاي بيولوژي مولكولي و به ويژه روش RAPD-PCR برای اولين بار ميزان شيوع شيگلا سونه‌اي در بيمارستان‌هاي تهران مورد ارزيابي قرار گيرد. بر اساس اطلاعات ما تا زمان انجام اين تحقيق بررسي مشابهي در اين مورد در ايران صورت نگرفته است. درضمن رديابي اپيدمي هاي ناشي از شيگلا با روش‌هاي سنتي بسيار وقت گير است و در خيلي از موارد نمي‌توان سويه‌هاي دخيل در اپيدمي را از سويه‌هاي آندميك متمايز نمود. همچنين استفاده از آنها به علت غير ممكن بودن تيپ بندي برخي سويه‌ها با محدوديت‌هايي

هـراه بـوده اسـت. جهـت حـل ایـن مشـکل از روش RAPD-PCR که داراي قابليت تشخيص و افتراق بالا، قدرت تکرار پذيري زياد، هزينه کم، سريع و آسان جهـت طبقه بندي ايزوله‌هاي شيگلا مي باشد استفاده شد.

روش بررسي

جمعيت مورد مطالعه: در اين مطالعه نمونـه‌هـا در طول سال‌های ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۵ از مدفوع بيمـاران مبـتلا بـه اسهال خونی که به بيمارستان‌های تهـران مراجعـه کردنـد تهيـه و سـريعاً بـه بخـش آزمايشـگاه ميکروبيولـوژی بيمارستان خاتم الانبياء(ص) تهران منتقـل شـدند و بـرای تشخيص و جداسازی شيگلا سونه‌ای مورد بررسـی قـرار گرفتند.

تمامی نمونه‌هـا در محـيط کشـت زيلـوز- ليـزين دوکسی کولات آگار (XLD) تلقيح و به مدت ۲۴ ساعت در دمـای ۳۷ درجـه سـانتيگراد انکوبـه شـدند. سـپس کلنی‌هـای لاکتـوز منفـی از پليـت‌هـای کشـت داده شـده برداشـت شـده و بـرای انجـام تسـت‌هـای بيوشـيمايی و سرولوژی جهت تشخيص احتمالی شيگلا سـونه‌ای مـورد استفاده قرار گرفتند(۸،۷).

برای تشخيص اوليه شيگلا سونه‌ای از تسـت‌هـای حرکت، MR ، سيترات H_2S ، اندل، ليزين دکربوکسيلاز، اورنيتين دکربوکسيلاز وONPG استفاده شد و نتايج ايـن تست‌ها با سويه شيگلا سونه‌ای رفرنس ATCC9290 به عنوان سويه کنترل مقايسه گرديد(۹،۶).

نمونه‌های باکتريايی شيگلا با آنتی سرم پلی کلونال (Mast Co. Merseyside U.K) کـه بـه صـورت تجاری در دسترس بـود بـا روش آگلوتيناسـيون بـر روی اسلايد مورد تاييد قرار گرفتند(۱۰،۶).

تست بررسی حساسيت باکتري‌ها به آنتي بيوتيـک‌هـا (آنتی بيوگرام):

تسـت بررسـی حساسـيت بـاکتري‌هـا بـه آنتـی بيوتيک‌های مختلف با روش انتشار ديسک توصيه شده به وسيله کميته CLSI با استفاده از ديسک‌های آنتی بيوتيک تجاری در دسترس(Mast Co) انجام شد. آنتـی بيوتيـک هـای مـورد اسـتفاده در ايـن بررسـی عبـارت بودنـد از: جنتامايسـين(۳۰ µl)- نالديکسـيک اسـيد(۳۰ µl)- سيپروفلوکساسين(۵µg)- کوتريموکسـازول (۲۵ µg) و تـری متـوپريم (۳۰ µg)- سفتريـاکسـون (۲۵ µg)- تتراسيکلين (۳۰ µg)- آموکسی سيلين (۳۰ µg). در اين بررسی تشکيل هاله رشد کمتر از ۱۳ ميلي متـر بـه عنـوان مقاوم و هاله بيشتر از ۱۸ ميلي متر به عنـوان حسـاس بـه آنتی بيوتيک تلقی مي‌شد(۱۱،۸).

نمونه‌های شيگلا سونه‌ای جدا شـده در گليسـرول ۱۵ درصد تهيـه و در دمـای منهـاي ۷۰ درجـه سـانتيگراد نگهداری شدند و هر دو تا سه ماه يک بـار بـا اسـتفاده از محيط انتقالی گليسرول- سـالين بـافر بـه آزمايشـگاه‌هـای تحقيقاتی بخش ميکروبيولوژی دانشگاه اصفهان برای تاييد مجـدد و انجـام روش RAPD-PCR بـا اسـتفاده از کيسه‌هـای يخـی و نگهـداری در شـرايط انجمـاد ارسـال شدند(۸).

تمامی نمونه‌ها در بخش ميکروبيولـوژی دانشـگاه اصفهان در ابتدا با انجام تست‌های فوق مورد تأييد مجـدد قرار گرفته و سپس تحت آزمايش RAPD-PCR قـرار گرفتند.

جهت استخراج DNA پس از تهيه کشت خالص از باکتري، يك كلني از باکتري بر روي محيط LB کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسيون در حرارت ۳۷ درجه سانتـيـگراد ۲ مـيـلـي‌لـيـتـر از سـوسـپـانـسـيون محيط کشـت بـاکتـري به مـدت ۵ دقيـقـه بـا ۴ هزار دور در دقـيـقـه سـانـتريفوژ گرديد. سپس مايع رويي را دور ريخته و به رسوب، ۶۲۰ ميلي ليتر از بافر ليز کننده (تريس ۱۰ ميلي مولار با pH هشت، ۵۰ ميلي مولار EDTA (Ethylene Diamid Tetra Acetic Acid) ۱۰۰ ميلي مولار کلريد سديم، يـک درصـد SDS و پروتئيناز K به مقدار ۰/۴ ميلي گرم در ميلي ليتر) اضافه گرديد. در مرحله بعد مخلوط بدست آمده در حرارت ۵۶ درجه سانتيگراد به مدت ۱ ساعت انکوبه مي‌گرديد و سپس در حـرارت ۱۰۰ درجـه سـانـتـي گراد به مدت ۱۰

دقيقه قرار داده مي‌شد. سپس به اندازه هم حجم آن، از مخلوط فنل- كلروفرم- ايزوآميل الكل (۲۵:۲۴ :۱ v/v/v) به آن اضافه نموده و لوله‌ها ابتدا به طور مختصر ورتكس مي‌گرديدند و سپس در حرارت ۴ درجه سانتيگراد به مدت ۱۰ دقيقه با ۱۳ هزار دور در دقيقه سانتريفيوژ مي شدند. در مرحله بعد مايع رويي را جدا نمودند و جهت حذف مقدار ناچيز فنل در نمونه، هم اندازه حجم آن كلروفرم اضافه و در حرارت ۴ درجه سانتيگراد به مدت ۱۰ دقيقه با ۱۳ هزار دور در دقيقه سانتريفيوژ گرديد. سپس لايه بالايي را جدا كرده و به دو برابر حجم آن ايزوپروپانول سرد اضافه شد و نمونه‌ها در حرارت منفي ۲۰ درجه سانتيگراد به مدت ۱۰ دقيقه قرار داده شدند. در مرحله بعد لوله‌ها در حرارت ۴ درجه سانتيگراد به مدت ۱۵ دقيقه در۱۳ هزار دور در دقيقه سانتريفوژ مي‌گرديدند و مايع رويي جدا و جهت شستشوي رسوب، مقدار۱۵۰۰ ميكروليتر از اتانل سرد ۷۰ درصد اضافه و در حرارت ۴ درجه سانتيگراد به مدت ۵ دقيقه با ۱۳ هزار دور در دقيقه سانتريفيوژ انجام شد. مايع رويي جدا و رسوب در هوا خشک شده و رسوب در ۱۰۰ ميكروليتر از بافر TE (Tris-HCL در مقدار ۱۰ ميلي مولار و EDTA) حل گرديد(۱۳،۱۲).

RAPD-PCR

جهت انجام RAPD-PCR از پرايمر ARB11 (5'-CTAGGACCGC-3') استفاده گرديد(۵ ،۱۳).

واكنش PCR در ۵۰ ميكروليتر محلول به شرح ذيل انجام گرفت.

Water: 26.5µL
10X PCR buffer: 5µL
$Mgcl_2$ (25mM): 5µL
dNTPs (1mM): 5µL
Primer (10pmol /µL): 5µL
Taq polymerase (5u /µL): 0.5µL
DNA (20ng/ µL): 3µL

چرخه PCR به صورت زير انجام گرفت (۱۴،۱۳).

Pre-PCR: 94°C/5mim
PCR: [94°C/30sec.- 40°C/1mim.- 72°C/1mim.]-35 cyclos
Final extension: 72°C/7mim

از آگارز ۱ درصد حاوي نيم ميكروگرم در ميلي ليتر اتيديوم بروميد جهت الكتروفورز استفاده گرديد. حدود ۲۰ ميكروليتر از هر محصول PCR به هر كدام از چاهک‌هاي ژل منتقل گرديد و به مدت ۲ ساعت در ۱۲۰ ولتاژ الكتروفورز گرديدند. ژل‌ها بر روي ترانسلومیناتور قرار داده شدند و از باندهاي مشاهده شده عكس تهيه گرديد و تصاوير ژل‌ها جهت آناليزهاي بعدي و طبقه بندي ايزوله‌ها بر روي ديسكت ثبت مي‌گرديد.

يافته‌ها

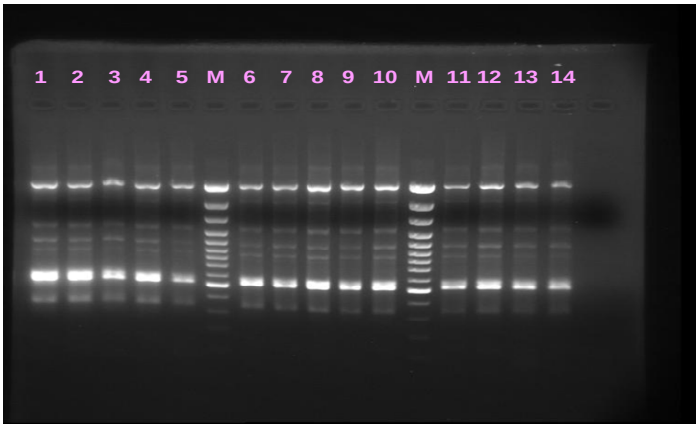
با انجام تست‌های بیوشیمیایی و سرولوژی تعداد ۶۰ نمونه آلوده به شیگلا سونه‌ای تشخیص داده شد. نتایج بررسی آنتی بیوگرام نشان داد که بیشتر از ۹۶ درصد سویه ها (۵۸ ایزوله) به کوتریموکسازول و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. در حالي كه تمامی ایزوله‌ها (۱۰۰ درصد) حساس به سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و سفترياكسون بودند و تعداد۵۱ سویه (۸۵ درصد) به آموکسی سیلین و تتراسیکلین و تعداد ۵۹ سویه (۹۸ درصد) به تری متوپریم حساس بودند.

در بين نمونه‌های مدفوع بیماران مبتلا به اسهال خونی، كلاً۶۰ بيمار، مبتلا به عفونت شيگلا سونه‌اي بودند كه ۳۶ نفر پسر(۶۰ درصد) و ۲۴ نفر دختر (۴۰ درصد) بودند. اين بيماران به ۵ گروه مختلف تقسيم شدند. بيشترين ايزوله‌ها در گروه ۱ قرار گرفتند كه شامل ۳۹ مورد (۶۵ درصد) بود. در گروه ۲ تعداد ۶ مورد (۱۰ درصد) و در گروه ۳ تعداد ۷ مورد (۱۱/۸ درصد) و در گروه ۴ تعداد ۴ مورد (۶/۶ درصد) و در گروه ۵ تعداد ۴ مورد (۶/۶ درصد) قرار داشت. بيشترين ميزان شيوع در گروه سني ۱ تا ۲ سال مشاهده گرديد، به طوري كه در اين گروه ۲۲ بيمار(۳۶/۷ درصد) به شيگلا سونه‌اي مبتلا بودند. همچنين كمترين ميزان شيوع در گروه سني بيشتر

از ۹ سال مشاهده گردید. توزیع فراوانی بیماران مبتلا به عفونت شیگلا سونه‌اي بر حسب سن در جدول ۱ نشان داده شده است.

پس از انجام الکتروفورز و مشاهده عکس‌هاي تهیه شده از ژل‌هاي آگارز مشخص گردید که ۶۰ ایزوله شیگلاسونه‌اي در پنج گروه مختلف قرار مي‌گیرند و بیشترین ایزوله‌ها ۳۹ مورد (۶۵ درصد) در گروه ۱ قرار گرفتند. جدول ۲ توزیع فراواني الگوهاي مشاهده شده و در شکل ۱ شایع‌ترین الگو نشان داده شده است.

همان طور که در شکل دیده می‌شود در ردیف‌های۱ تا ۱۴ باندهای مولکولی کاملا مشابه و غیر قابل تفکیکی دیده مي‌شود که نشان دهنده این نکته است که سویه های باکتریایی عامل شیگلوزیس دارای یک منشاء و با درصد اطمینان بیشتري دارای قرابت ژنتیکی بسیار نزدیکی بوده‌اند.



شکل۱: ژل الکتروفورز محصول RAPD-PCR مربوط به الگوي شماره۱. ردیف‌هاي ۱ تا ۱۴ مربوط به برخي از سویه‌هاي داراي الگوي شماره۱. ردیف‌هاي M مربوط به مارکر ۱۰۰ جفت بازي

جدول ۱: توزیع فراواني بیماران مبتلا به عفونت شیگلا سونه‌اي بر حسب سن در بیمارستان‌هاي شهر تهران

سن به سال	نتایج	
	تعداد	درصد
<۱	۷	۱۱/۷
۱-۲	۲۲	۳۶/۷
۳-٤	۸	۱۳/۳
۴-۵	۷	۱۱/۷
۵-۶	۶	۱۰
۶-۷	۴	۶/۷
۷-۸	۲	۳/۳
۸-۹	۳	۵
>۹	۱	۱/۶
جمع	۶۰	۱۰۰

جدول ۲: توزيع فراواني الگوهاي مشاهده شده توسط RAPD-PCR در بين ۶۰ ايزوله شيگلا سونه‌اي

شماره الگو	نتايج تعداد	درصد
۱	۳۹	۶۵
۲	۶	۱۰
۳	۷	۱۱/۸
۴	۴	۶/۶
۵	۴	۶/۶

جدول۱ توزيع فراوانی بيماران مبتلا به عفونت شيگلا سونه‌ای را بر حسب سن در بيمارستان‌های شهر تهران نشان مي‌دهد. همان طور كه از جدول پيداست بيشترين ميزان ابتلاء در گروه سني ۱ تا ۲ سال ديده مي شود. و كمترين ميزان ابتلاء در افراد بيشتر از ۹ سال است.

جدول۲ توزيع فراواني الگوهاي مشاهده شده توسط RAPD-PCR در بين۶۰ ايزوله شيگلا سونه‌اي را نشان مي‌دهد كه در آن ۳۹ نفر از افراد آلوده دارای توزيع الگوی يكسانی از نظر باند ايجاد شده در آزمايش RAPD را نشان مي‌دهند كه نشان دهنده يكی بودن عامل بيماری و يا با اطمينان ۱۰۰ درصد قرابت ژنتيكی بسيار نزديک عوامل بيماری مي‌باشد.

بحث

شيگلوزيس يک گاستروآنتريت حاد است كه بوسيله انواع سويه‌های شيگلا ايجاد مي‌شود و يكی از عمده‌ترين عوامل بيماری و مرگ و مير در كودكان مبتلا به اسهال در كشورها و يک مشكل عمده سلامت عمومی در سطح جهانی است (۱۱،۱۰). ميزان ابتلاء به شيگلوزيس در جهان سالانه ۱۶۴/۷ ميليون نفر است كه معمولا ۶۹ درصد موارد مرگ و مير در كودكان كمتر از ۵ سال مبتلا به اسهال را سبب می‌شود(۱۵،۱۱،۸). اين بيماری به شدت مسری بوده و از طرفی وجود الگوهای مقاومت چند آنتی بيوتيكی در اين باكتري‌ها اهميت آنها را از نظر مطالعات اپيدميولوژيكی و كلينيكی بيش از پيش نشان مي دهد(۸،۶).

عفونت با شيگلا سونه‌ای بيشتر در كشورهای توسعه يافته بروز مي‌كند و از آنجا كه ايران نيز جزء كشورهای توسعه يافته و يا در حال توسعه مي‌باشد شيوع شيگلا سونه‌ای در آن شبيه ايالات متحده و ساير كشورهای اروپايی مي‌باشد يعنی در بيش از ۷۰ درصد موارد در كودكان كمتر از ۵ سال و به ويژه نوزادان بروز مي‌كند كه به علت وضعيت سيستم ايمنی آنها و عدم رعايت بهداشت فردی در آنها همانند بزرگسالان و ساكن بودن در مكان‌های پر ازدحام (مهدكودک‌ها) است(۸ ،۱۱).

روش‌هاي طبقه بندي متعددي جهت گروه‌بندي سويه‌هاي شيگلا طراحي شده است. در ارزيابي سيستم‌هاي طبقه بندي در مطالعات اپيدميولوژي بر روي عوامل عفوني چندين معيار اساسي از جمله قدرت افتراقي تكنيک، قابليت تيپ بندي و تكراريذيري بسيار مهم مي‌باشند. چندين روش بر پايه فنوتيپي و يا ژنوتيپي جهت طبقه بندي شيگلا طراحي گرديده است.

روش‌هاي فنوتيپي كه براي طبقه بندي شيگلا بكار رفته‌اند قدرت افتراق دهندگي كمي دارند. استفاده از پلي آكريل آميد ژل الكتروفورز (Poly achryl amid gel electrophoresis) جهت آناليز پروتئين‌هاي باكتريايي تا اندازه‌اي مؤثر است. بويژه هنگامي كه با نشان‌دار كردن متيونين يا با روش ايمنوبلاتينگ حساسيت تكنيک افزايش يابد. سيستم‌هاي طبقه بندي بر اساس آناليز پلاسميدها و

باکتریوفاژتایپینگ نیز در مورد شیگلا استفاده شده‌اند، اما ردیابي اپیدمي‌هاي ناشي از شیگلا با روش‌هاي سنتي بسیار وقت‌گیر بوده و همچنین در خیلي از موارد نمي‌توان به درستي سویه‌هاي دخیل در اپیدمي را از سویه‌هاي آندمیک متمایز نمود. همچنین استفاده از آنها به علت غیرقابل تیپ بندي برخي سویه‌ها با محدودیت‌هایي همراه بوده است. جهت حل این مشکل، نیاز است از روش‌هاي با قدرت تکرارپذیري بالا، کم هزینه، سریع و آسان جهت طبقه بندي ایزوله‌هاي شیگلا استفاده شود(۵، ۶).

به کارگیري روش‌هاي بیولوژي مولکولي در بیشتر آزمایشگاه‌هاي میکروبیولوژي باعث شده است تمایل به استفاده از روش‌هاي ژنوتایپینگ از جمله PFGE، ریبوتایپینگ بر اساس آنالیز ساترن بلات قطعات برش داده شده اپرون‌هاي ریبوزومي و روش‌هاي بر پایه PCR همانند AP-PCR ، RAPD-PCR ، ERIC-PCR و REP-PCR بیشتر شود(۵).

شیگلا نیز همانند بسیاري از باکتري‌ها داراي اپرون‌هاي ریبوزومي متعددي بوده و به طور تیپیک پس از ریبوتایپینگ بر اساس آنالیز ساترن بلات قطعات برش داده شده اپرون‌هاي ریبوزومي، داراي حدود ۲۴ باند کاملاً مشخص مي‌باشد، اگرچه قدرت افتراق دهندگي این تکنیک به علت فراواني کم سایت‌هاي مربوط به آنزیم‌هاي برش دهنده در داخل اپرون‌هاي ریبوزومي، محدود است. اخیراً تکنیک‌هاي مولکولي بر اساس پلي مرفیسم موجود در DNA طراحي شده‌اند. در روش AP-PCR مي‌توان به شناسایي پلي مرفیسم ها در داخل ژنوم هدف بدون داشتن اطلاعاتي از سکانس نوکلوتیدهاي هدف پرداخت. روش Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) در حقیقت یک نوع PCR تعدیل شده است جهت طبقه بندي سریع ایزوله‌ها که قادر است پلي مرفیسم‌هاي موجود در سکانس‌هاي DNA، بین ایزوله‌هاي مختلف شیگلا بدون دانستن اطلاعاتي از سکانس‌هاي نوکلئوتیدي DNA هدف را شناسایي نماید. در این روش اغلب از یک پرایمر استفاده مي‌شود که طول آن ممکن است تا ۵۰ نوکلئوتید باشد که این پرایمر قادر است به قسمت‌هایی از ژنوم باکتری جفت شده و با شروع همانند سازی از آن در طول چرخه PCR قطعاتی از DNA تولید نماید که براي هر سویه از باکتری اختصاصی و منحصر به فرد باشد به همین دلیل به این تکنیک، انگشت نگاری ژنومی از میکروارگانیسم نیز مي‌گویند و این تکنیک قادر به شناسایی باکتري‌ها در حد سویه مي‌باشد و مي‌توان از آن براي تعیین خصوصیات مولکولی یک باکتری و آنالیزهاي فیلوژنیک و مطالعات اپیدمیولوژیک استفاده نمود(۱۷،۱۶،۱۳).

در این بررسی سعی شد تا میزان ابتلاء به شیگلا سونه‌ای در بیماران مبتلا به اسهال خونی مراجعه کننده به بیمارستان‌های تهران در طی سال های ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۵ با روش RAPD-PCR براي اولین بار در ایران و همچنین الگوهاي مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه هاي باکتریایی شیگلا سونه‌اي مورد بررسی قرار گیرند.

بررسی نتایج آنتی بیوگرام نشان داد که بیشتر از ۹۶ درصد سویه ها (۵۸ ایزوله) به کوتریموکسازول و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. در حالیکه تمامی ایزوله ها (۱۰۰ درصد) حساس به سیپروفلوکساسین، جنتامایسین و سفتریاکسون بودند و تعداد۵۱ سویه (۸۵ درصد) به آموکسی سیلین و تتراسیکلین و تعداد ۵۹ سویه(۹۸ درصد) به تري متوپریم حساس بودند که نتایج فوق با مطالعات به عمل آمده توسط فرشاد و همکاران در ایران در سال ۱۳۸۲ مطابقت دارد(۶).

همچنین نتایج پژوهش به عمل آمده توسط wang و همکاران در مورد الگوی حساسیت دارویی سویه هاي شیگلا به آنتی بیوتیک‌ها در سال ۲۰۰۵ میلادی با نتایج این پژوهش هم خوانی دارد (۱۱) ولی با نتایج بدست آمده از پژوهش Bando و همکاران در سال ۱۹۹۸ در کشور برزیل اندکی تفاوت وجود دارد(۱۳). شاید این اختلاف به دلیل متفاوت بودن الگوهاي مقاومت آنتی بیوتیکی در میان سویه‌هاي شیگلا سونه‌اي باشد.

در این بررسی جهت انجام RAPD-PCR از پرایمر ARB11 به طول ۱۰ نوکلئوتید استفاده شد و مشخص گردید که ۷۳/۳۳ درصد افراد مبتلا به شیگلا سونه‌ای را کودکان کمتر از ۵ سال سن تشکیل می‌دادند که ۶۰ ایزوله شیگلا سونه‌اي در پنج گروه مختلف قرار گرفتند و بیشترین ایزوله‌ها در گروه ۱ قرار داشت[۳۹ مورد (۶۵ درصد)] و همچنین مشخص شد که این روش، مي‌تواند به عنوان یک ابزار سودمند و روشی با قدرت افتراق بالا در تشخیص سویه‌های باکتریایی در مطالعات اپیدمیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد.

در پژوهش به عمل آمده توسط فرشاد و همکاران در سال ۱۳۸۵ که بر روی ۷۱۹ نمونه بیمار مبتلا به اسهال خونی در بیمارستان های شیراز انجام گرفت با استفاده از تکنیک‌های آنالیز پلاسمیدی و PCR توانستند در ۷۴/۳۹ درصد مبتلایان، ایزوله‌های شیگلا سونه‌ایی را جدا کنند و مشخص شد که سویه غالب در کشور ما شیگلا سونه‌ای بوده و بیشتر در کودکان شایع مي‌باشد و روش آنالیز پلاسمیدی را روشی مناسب برای تشخیص ارتباط احتمالی ایزوله‌های کلینیکی در مطالعات اپیدمیولوژیک یافتند(۶).

در مطالعه‌ای که توسط Bando و همکاران در سال ۱۹۹۸ در سائوپائولو کشور برزیل برای تشخیص بین ایزوله‌های اشریشیا کلی انتروانوسیو (EIEC) وسویه‌های شیگلا انجام شد این نتیجه حاصل شد که آنالیز RAPD یک روش سریع، مناسب و یک استراتژی با ارزش در تشخیص اختصاصی جنس، گونه و سویه باکتریایی و یک روش انگشت نگاری DNA سودمند مي‌باشد(۱۳).

در مطالعه‌اي که توسط جعفری و همکاران در شهر تهران انجام گرفت آنها به طور همزمان دو روش ریبوتایپینگ و RAPD-PCR را جهت تشخیص ایزوله‌های شیگلا سونه‌ای مورد ارزیابی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که روش ریبوتایپینگ با استفاده از اندونوکلئازMulI روش مفیدی در تشخیص ایزوله‌های شیگلا سونه‌ای مي‌باشد و براساس آن ایزوله ها در ۴ الگوی متفاوت قرار گرفتند اما روش RAPD-PCR با استفاده از پرایمر۱۲۳۸ دارای قدرت افتراق و تشخیص بهتری نسبت به ریبوتایپینگ بوده و بر اساس آن ایزوله‌ها در ۵ گروه متفاوت قرار گرفتند که هر گروه دارای الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی خاص خود مي‌باشد(۱۸) که نتایج مطالعات فوق همگی با نتایج حاصل از این بررسی همخوانی و مطابقت دارند.

در مطالعه ای که توسط رنجبر و همکاران با استفاده از ریبوتایپینگ و RAPD-PCR در شهر تهران انجام گرفت در روش ریبوتایپینگ از آنزیم هایPvuII ، HindII ، HindIII و SalI و در روش RAPD از پرایمرهای ARB11 و AP-PG05 استفاده نمودند که در استفاده از روش ریبوتایپینگ همه ایزوله‌ها ایجاد قطعات مولکولی مشابه به ترتیب ۹ و ۱۶ تایی مي‌کرد ولی روش RAPD ایجاد ۹ باند غیر قابل تشخیص در تمام ایزوله‌های شیگلا نمود که نشان دهنده یک الگوی مولکولی منفرد در تمام ایزوله های شیگلا سونه‌ای بود و بر اساس آن نتیجه گرفتند که یک گروه کاملا هموژن از سویه های شیگلا سونه‌ای عامل عفونت‌های ایجاد شده در بیمارستان‌های تهران بوده است و بنابراین روش RAPD را روش مناسب‌تری در تشخیص سویه‌های شیگلا مي‌دانست(۲۲).

Killgore وKato از روش AP-PCR براي تايپينگ ۴۱ ايزوله جدا شده از يک اپيدمي (Clostridium difficile associated diarrhaea) استفاده نمودند(۲۰). آنها نتايج اين روش را با ايمونوبلاتينگ مقايسه كردند و گزارش نمودند كه در ۳۳ ايزوله از ۳۴ ايزوله‌اي كه با روش ايمونوبلاتينگ قابل تيپ بندي بودند، نتايج هر دو روش با همديگر هم خواني داشت اما هفت ايزوله‌اي كه با روش ايمونوبلاتينگ قابل تيپ بندي نبودند با روش AP-PCR تيپ بندي شدند(۲۰).

Barbut و همکاران از روش RAPD با استفاده از دو پرايمر ۱۰ نوكلئوتيدي به نام هاي AP4 و

AP5 جهت تايپينگ ايزوله‌هاي كلستريديوم ديفيسيل جدا شده از بيماران ايدزي مبتلا به CDAD استفاده نمودند(۱). آنها گزارش نمودند كه در ۲۵ ايزوله جدا شده از ۱۵ بيمار الگوي PCR يكسان بوده و نتيجه گرفتند كه عفونت با يک سويه اتفاق افتاده است. آنها همچنين ادعا نمودند كه انجام تكنيک RAPD بسيار آسان بوده و يک روش مؤثر در طبقه بندي ايزوله‌هاي كلستريديوم ديفيسيل به حساب مي‌آيد(۲۱).

در سال‌هاي اخير اپيدمي‌هايي از عفونت شيگلا سونه‌اي به عنوان يک مشكل مهم در بهداشت عمومي مطرح شده است. در مطالعه حاضر پروفايل ژنوميک سويه‌هاي شيگلا سونه‌اي جدا شده از بيمارستان‌هاي شهر تهران با روش RAPD-PCR تعيين گرديد.

در مطالعات گذشته مشخص گرديده است كه سن به عنوان يک فاكتور خطر در ابتلا به عفونت شيگلا عمل مي‌نمايد و بچه‌هاي كمتر از يک سال در معرض خطر ابتلا به عفونت هستند. در مطالعه حاضر بيشتر سويه‌ها از كودكان كمتر از ۶ سال ايزوله گرديد. اطلاعات ايزولاسيون هر سويه نشان داد كه بين باكتري‌ها توزيع فصلي وجود دارد و بيشترين ميزان ايزولاسيون(۸۵ درصد) در ماه‌هاي گرم سال (خرداد تا مهر ماه) بوده است و اين اطلاعات نشان مي‌دهد كه بين شرايط محيط و ارگانيسم ارتباط وجود دارد.

در مطالعه‌اي كه توسط Ming Lee و همكاران برروي آناليز مولوكولي شيگلا سونه‌اي ايزوله شده از سه اپيدمي در بچه‌هاي مدرسه انجام گرفت مشخص گرديد با روش PFGE ده الگوي مختلف در ميان ۶۶ ايزوله شيگلا سونه‌اي و با روش ريبوتيپينگ با استفاده از Hind2 تنها يک ايزوله الگوي متفاوت از بقيه داشت(۷).

مطالعه حاضر نشان داد كه RAPD- PCR قدرت تمايز دهندگي نسبتاً مناسبي دارد و ايزوله ها در ۵ گروه تقسيم‌بندي شدند و ۶۵ درصد سويه‌ها در يک گروه خاص قرار مي گرفتند و اين حكايت از آن دارد كه انتقال شخص به شخص در بين ايزوله‌ها وجود داشته است و اين گروه مشابه يک منشاء دارند. اين مطالعه اطلاعات پايه‌اي فراهم نمود و مشخص گرديد كه به كمک RAPD-PCR مي‌توان به صورت روتين به طبقه بندي ايزوله‌هاي شيگلا سونه‌اي پرداخت و به عنوان وسيله‌اي جهت ارزيابي و تشخيص منبع اپيدمي‌ها از آن استفاده نمود.

در مطالعه‌اي كه توسط Chien-Ku و همكاران در تشخيص سويه های اشريشيا كلی O157:H7/NM به عمل آمد ضمن اينكه روش RAPD- PCR را يک روش مناسب برای تشخيص سويه‌های باكتريايی می‌داند معايب اين روش را نيز ذكر مي‌كند. با توجه به اينكه سويه هاي باكتريايي و مخصوصاً خانواده انتروباكتریاسه قرابت ژنتيكی زياد و نزديكی وجود دارد اگر پرايمرهای مورد استفاده به درستی طراحی و Blast نشوند و يا در واكنش زنجيره‌ای PCR پديده سرد شدن آهسته بدرستی انجام نشود احتمال وجود نتايج منفی و يا مثبت كاذب در روش آزمايش RAPD-PCR اجتناب‌ناپذير خواهد بود(۱۶).

نتيجه گيري

در نتيجه گيري نهايي مي‌توان گفت كه دلايل متعددي وجود دارند كه نشان مي‌دهند شيگلا بواسطه چندين فاكتور و ويژگي از جمله دوز عفوني كننده خيلي پايين باكتري (به طوري كه تنها وجود ۱۰۰ باكتري براي ايجاد علائم كفايت مي‌كند)، راه‌هاي انتقال متعدد از جمله آب آلوده، مواد غذايي، ناقلين بي‌جان، حشرات، انتقال از طريق دست و مقاومت دارويي روز افزون و گسترده نسبت به آنتي بيوتيك‌ها كه امروزه به عنوان يكي از مهم ترين مشكلات علم پزشكي مطرح مي‌باشند، از طرفي قدرت انتشار بالا و ايجاد عفونت‌هاي ثانويه در جامعه، مرگ و مير نسبتاً بالا و ايجاد عوارض دستگاه عصبي مركزي، سندروم اورمي هموليتيك، سندرم رايتر و عوارض گوارشي مي‌تواند به عنوان يك تهديد بهداشتي مطرح باشد. مطالعه حاضر نشان داد كه RAPD-PCR قدرت تمايزدهندگي نسبتاً مناسبي دارد و ۶۵ درصد

سويه‌ها در يك گروه خاص قرار مي‌گيرند كه حكايت از انتقال شخص به شخص در بين ايزوله‌ها داشته و اين گروه مشابه داراي يك منشاء هستند.

اين مطالعه اطلاعات پايه‌اي فراهم نمود و مشخص گرديد كه به كمك RAPD-PCR مي‌توان به صورت معمول به طبقه بندي ايزوله‌هاي شيگلا سونه‌اي پرداخت و به عنوان وسيله‌اي مناسب جهت ارزيابي و تشخيص منبع اپيدمي‌ها از آن استفاده نمود.

منابع

1-Bern C, Martines J. The magnitude of the global problem of diarrheal disease: a ten-year update, Bull WHO. 1992; 70:705-14.

2-Green MS, Block C. Four decades of shigellosis in Israel: epidemiology of a growing public health problem. Rev Infect Dis 1991; 4: 248-53.

3-Henry FJ. The epidemiologic importance of dysentery in communities. Rev Infect Dis 1991; 4: 238-44.

4-Stoll BJ, Glass RI, Huq MI, Khan MU, Banu H, Holt J. Epidemiologic and clinical features of patients infected with Shigella who attended a diarrheal disease hospital in Bangladesh, J Infect Dis.1982;146(2): 177-83.

5-Chachaty E, Sauliner P, Martin A, Mario N, Andremont A. Comparison of ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA for typing Clostridium difficile strains. FEMS Microbiol Lett 1994; 122: 61–8.

6-Farshad S, Shaikhi R, Japoni A, Basiri E, Alborzi AV. Characterization of shigella strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR Amplification of ipa genes. J Clin Microbial 2006; 44:2879-83.

7-Ming Lee T, Chang LL, Chang CY, Wang JC, Pant TM, Wang TK,et al. Molecular analysis of Shigella sonnei isolated from three well-documented outbreaks in school children. J Med Microbiol 2000; 49:355-60.

8-Sur D, Ramamurthy T, Deen J, Bhattacharya SK. Shigellosis : challenges & management issues Indian J Med Res 2004,120:454-62.

9-Bolton RP, Tait SK, Dear PRF, Lowsowsky MS. Asymptomatic neonatal colonization by Clostridium difficile. Arch Dis Child. 1984;59: 466–72.

10-Coimbra RS, Lenormand P, Grimont F, Bouvet P, Matsushita S, Grimont PA. Molecular and phenotypic characterization of potentially new Shigella dysenteria serotypes. J clin microbiol 2001; 39(2):618-21.

11-Wang XY, Du L, Von Seidlein L, Xu ZY, Zhang YL, Hao ZY, et al. Occurrence of shigellosis in the young and elderly in rural China: result of a 12-Month population-based surveillance study. Am J Trop Med Hyg 2005;73(2):416-22.

12-McMillin DE, Muldrow LL. Typing of toxic strains of Clostridium difficile using DNA fingerprints generated with arbitrary polymerase chain reaction primers. FEMS Microbiol Lett 1992; 92:5–9.

13-Bando SY, do Valle GR, Martinez MB, Trabulsi LR, Moreira-Filho CA. Characterization of enteroinvasive Escherichia coli and Shigella strains by RAPD analysis. FEMS Microbiol Lett. 1998;165(1):159-65.

14-Thong KL, Hoe SL, Puthucheary SD, Yasin RM. Detection of virulence genes in Malaysian Shigella species by multiplex PCR assay. BMC Infect Dis. 2005;5(1):8.

15-Peng X, Luo W, Zhang J, Wang S, Lin S. Rapid Detection of Shigella Species in Environmental Sewage by an Immunocapture PCR with Universal Primers. Appl Environ Microbiol. 2002;68(5):2580-3.

16-Chien-Ku L, Jia-Chi L. Development of PCR primers based on a fragment from randomly amplified polymorphic DNA for the detection of Escherichia coli O157:H7/NM. Molecular and Cellular Probes 21. 2007; 182–9.

17-NCCLS. 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard. NCCLS document M2-A8. 8th ed. Wayne, Pennsylvania. NCCLS, 2003.

18-Jafari F, Salmanzadeh–Ahrabi S, Feizabadi M, Mohaghegh–Shalmani H, Zali M. Molecular typing of Shigella sonnei isolates by RAPD- PCR and ribotyping. J Clin Microbiol Infect 2006;12(4): 36. [P537].

19-Blaser, MJ, Pollard RA, Feldman RA. Shigella infections in the United States, 1974–1980. J Infect Dis. 2003;147:771–5.

20-Killgore GE, Kato H. Use of arbitrary primer PCR to type Clostridium difficile and comparison of results with those by immunoblot typing. J Clin Microbiol. 1994; 32:1591-3.

21-Barbut F, Mario N, Meyohas MC, Binet D, Frottier J, Petit JC. Investigation of a nosocomial outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhoea among AIDS patients by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. J Hosp Infect 1994; 26:181–9.

22-Ranjbar R, Soltan Dallal MM, Pourshafie MM, Aslani MM, Sadeghifard N, Zaeimi-yazdi J, et al. Ribotyping and RAPD-PCR analysis suggest a close genetic relation among S.sonnei strains isolated in Tehran,Iran in 2003. Clin.Chem.Lab.Med.2007; 45(S1):S128.

The Investigation of Molecular Epidemiology of *Shigella Soneii* Isolated from Clinical Cases in Tehran Using RAPD-PCR Method

Rostamzad A[*1], Zarkesh Esfahani SH[2], Enteshari J [3]

Department of Microbiology,University of Isfahan, Isfahan, Iran

Abstract

Backgrond and Objective: Bloody diarrhea (Shigellosis) is caused by different species of Shigella and is often seen in **children befor than under 15 years old must be aded**. less than 15 years of age. This disease is extremely contagious, epidemic and endemic in communities with low level hygiene and in majority of cases is accompanied with hemolytic uremia syndrome and decreased children's growth. As the rate of infection by *Shigella soneii* among different ranges of age is considered as an indicator of hygiene level, this study was designed to detect the rate of infection by *Shigella sonei* among different ranges of ages in Tehran by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) between 2002-2006.

Subjects and Methods: In this study totally 60 isolates of *Shigella soneii* taken from 36 (60%) boys and 24 (40%) girls were studied. All isolates were primary confirmed as Shigella species by biochemical (Motility, MR, Citrate, H_2S, Indole, Lysin decarboxylase, Ornitin decarboxylase, ONPG) and serologic tests; then all isolates were finally confirmed as *Shigella soneii* by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) test. Among all 60 patients, the highest rate of infection with *Shigella soneii* belonged to 1-2 year-old group (36/7%). Furthermore, the lowest rate of infection belonged to group with more than 9 years of age (1/6%).

Conclusion: This study showed that RAPD PCR method had a relative good discrimination power, and was a good method for typing of Shigella isolates in molecular epidemiological studies according to its high discrimination power, typing ability, reproducibility, low cost, rapidity and easy of use.

Sci Med J 2010; 9(3):279-289

Keywords: Shigellosis, Epidemiology, RAPD-PCR.

Received: Feb 28, 2009 **Revised: April 6, 2010** **Accepted: April 20, 2010**

[*]Corresponding author email: arostamzad381@yahoo.com